

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-507442

(P2013-507442A)

(43) 公表日 平成25年3月4日 (2013.3.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/501 (2006.01)	A 6 1 K 31/501	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-534272 (P2012-534272)
 (86) (22) 出願日 平成22年10月12日 (2010.10.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年6月4日 (2012.6.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/052242
 (87) 国際公開番号 W02011/046894
 (87) 国際公開日 平成23年4月21日 (2011.4.21)
 (31) 優先権主張番号 61/250,635
 (32) 優先日 平成21年10月12日 (2009.10.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591002957
 グラクソスミスクライン・リミテッド・ラ
 イアビリティ・カンパニー
 GlaxoSmithKline LLC
 アメリカ合衆国19102ペンシルベニア
 州フィラデルフィア、ノース・シックス
 イーンズ・ストリート200番、ワン・フ
 ランクリン・プラザ
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝

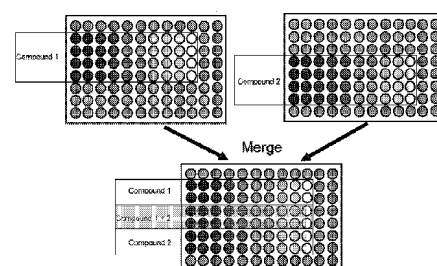
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組合せ

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物における癌の治療法およびその治療において有用な薬剤の組合せに関する。この方法は特に、MEK阻害剤であるN - { 3 - [3 - シクロプロピル - 5 - (2 - フルオロ - 4 - ヨード - フェニルアミノ) 6 , 8 - ジメチル ; - 2 , 4 , 7 - トリオキソ - 3 , 4 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 2 H - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 1 - イル] フェニル } アセトアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、PI3キナーゼ阻害剤阻害剤である2,4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩と含んでなる新規な組合せ、それを含んでなる医薬組成物、および癌治療における上記組合せの使用法に関する。

Figure 1. Representation of plate arrangements for Fixed concentration dosing in a 96 well plate.

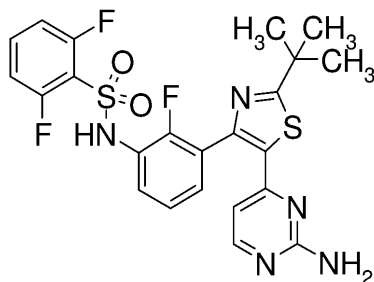


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 構造 (I) の第一の化合物：

【化 1】

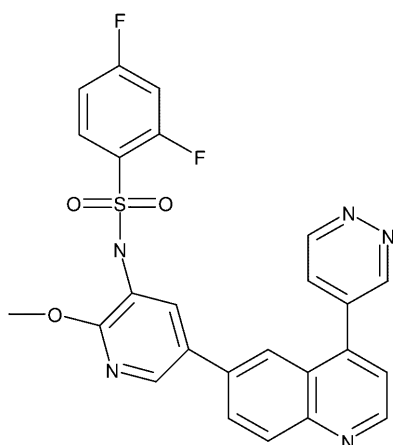


10

またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、

(i i) 構造 (I I) の化合物である第二の化合物：

【化 2】



20

またはその薬学的に許容される塩と
を含んでなる組合せ。

【請求項 2】

30

前記構造 (I) の化合物がメタンスルホン酸塩の形態であり、かつ前記構造 (I I) の化合物が遊離塩基の形態である、請求項 1 に記載の組合せ。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の組合せを、薬学的に許容される 1 つまたは複数の担体と共に含んでなる、組合せキット。

【請求項 4】

前記構造 (I) の化合物の量が、10 mg ~ 300 mg から選択される量であり、かつその量が 1 日 1 ~ 4 回投与され、前記構造 (I I) の化合物の量が、0.5 mg ~ 20 mg から選択される量であり、かつその量が 1 日 1 回投与される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組合せ。

40

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組合せを、薬学的に許容される 1 つまたは複数の担体と共に含んでなる、組合せキット。

【請求項 6】

治療を必要とするヒトにおける癌の治療法であって、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩と、2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドとの組合せの治療有効量を、前記ヒトに *in vivo* 投与することを含んでなる、前記組

50

合せを一定期間内に投与し、かつ前記組合せを継続期間の間投与する治療法。

【請求項 7】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドメタンスルホン酸塩と、 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドとの組合せの治療有効量を、前記ヒトに *in vivo* 投与することを含んでなる、前記組合せを一定期間内に投与し、かつ前記組合せを継続期間の間投与する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩の量が、約 10 mg ~ 約 300 mg から選択され、かつその量が 1 日 1 ~ 3 回投与され、 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドの量が、約 0 . 5 mg ~ 約 10 mg から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩の量が、約 70 mg ~ 約 260 mg から選択され、かつその量が 1 日 2 回投与され、 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドの量が、約 0 . 5 mg ~ 約 6 mg から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩と、 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドを、少なくとも連続 7 日間の期間に、互いに 12 時間以内に毎日投与する (1 サイクル以上の反復投与サイクルがこれに続いてよい)、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドメタンスルホン酸塩と、 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドの量を、少なくとも連続 14 日間の期間に、互いに 12 時間以内に毎日投与する (1 サイクル以上の反復投与サイクルがこれに続いてよい)、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

1 サイクル以上の投与サイクルを含んでなる、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法であって、前記各サイクルが、

(1) 約 10 ~ 300 mg の N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 日 1 ~ 4 回で 1 ~ 30 日間、前記ヒトに投与することと、

(2) 約 0 . 05 mg ~ 10 mg の 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホ

10

20

30

40

50

ンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、定期的に前記ヒトに投与することと、

を含んでなる、治療法。

【請求項 1 3】

1 サイクル以上の投与サイクルを含んでなる、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法であって、前記各サイクルが、

(1) 約 70 ~ 260 mg の N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 日 1 ~ 4 回で 1 ~ 30 日間、前記ヒトに投与することと、

(2) 約 0.5 ~ 5 mg の 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 ~ 30 日間、定期的に前記ヒトに投与することと、

を含んでなる、治療法。

【請求項 1 4】

1 サイクル以上の投与サイクルを含んでなる、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法であって、前記各サイクルが、

(1) 約 0.05 ~ 10 mg の 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 日 1 回または 2 回で、1 ~ 30 日間、前記ヒトに投与することと、

(2) 約 10 ~ 300 mg の N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 ~ 30 日間、定期的に前記ヒトに投与することと

を含んでなる、治療法。

【請求項 1 5】

1 サイクル以上の投与サイクルを含んでなる、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法であって、前記各サイクルが、

(1) 約 0.5 ~ 5 mg の 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 日 1 回または 2 回で、1 ~ 30 日間、前記ヒトに投与することと、

(2) 約 70 ~ 260 mg の N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 ~ 30 日間、定期的に前記ヒトに投与することと

を含んでなる、治療法。

【請求項 1 6】

2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドを 2 ~ 4 日に 1 回投与する、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドを 5 ~ 7 日に 1 回投与する、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドを 8 ~ 15 日に 1 回投与

10

20

30

40

50

する、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 19】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドメタンスルホナートを 2 ~ 4 日に 1 回投与する、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 20】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドメタンスルホナートを 5 ~ 7 日に 1 回投与する、請求項 14 または 15 に記載の方法。

10

【請求項 21】

N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドメタンスルホナートを 8 ~ 15 日に 1 回投与する、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 22】

1 サイクル以上の投与サイクルを含んでなる、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法であって、前記各サイクルが、約 10 ~ 300 mg の N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 日 1 ~ 4 回で、5 ~ 14 日間、前記ヒトに投与し、次いで約 0.05 ~ 10 mg の 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、5 ~ 14 日間、前記ヒトに投与することを含んでなる、治療法。

20

【請求項 23】

1 サイクル以上の投与サイクルを含んでなる、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法であって、前記各サイクルが、約 70 ~ 260 mg の N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、1 日 1 ~ 2 回で、5 ~ 14 日間、前記ヒトに投与し、次いで約 0.5 mg ~ 5 mg の 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、5 ~ 14 日間、前記ヒトに投与することを含んでなる、治療法。

30

【請求項 24】

前記癌が黒色腫または結腸癌である、請求項 12 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記癌が BRAF 変異体である、請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 26】

前記第二の化合物が遊離塩基の形態である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組合せ。

【請求項 27】

治療に使用するための、請求項 1 ~ 26 のいずれかに記載の組合せ。

【請求項 28】

癌治療に使用するための、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組合せ。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組合せを、薬学的に許容される担体と共に含んでなる、医薬組成物。

【請求項 30】

50

癌治療のための薬剤製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組合せの使用。

【請求項 3 1】

前記癌が、黒色腫、肺癌、膵臓癌、乳癌または結腸癌である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記癌が黒色腫または結腸癌である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記癌が B R a f 変異体である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記癌が、B R a f 阻害剤による治療後に進行した黒色腫である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

前記癌が B R a f 阻害剤に対して耐性をもつ黒色腫である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記癌が、B R a f 阻害剤による治療後に進行した結腸癌である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記癌が B R a f 阻害剤に対して耐性をもつ結腸癌である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、哺乳動物における癌の治療法およびその治療に有用な組合せに関する。特にこの方法は、B - R a f 阻害剤である N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、P I 3 K 阻害剤である 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩とを含んでなる新規な組合せ、これらを含んでなる医薬組成物および癌治療における上記組合せの使用法に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

癌を含めた高増殖性疾患の有効な治療は、腫瘍学分野における変わらない目標である。一般に癌は、細胞の分裂、分化およびアポトーシス細胞死を制御する正常なプロセスの調節解除から生じる。アポトーシス（プログラムされた細胞死）は、胚発生ならびに神経変性疾患、心血管疾患および癌のような各種疾患の病因において重要な役割を果たす。アポトーシスのキナーゼ調節に関与する経路の中で最も広く研究されている経路の 1 つが、細胞表面の増殖因子受容体から核への細胞シグナル伝達である（C r e w s および E r i k s o n , C e l l , 7 4 : 2 1 5 - 1 7 , 1 9 9 3 ）。

40

【0 0 0 3】

酵素の重要な一大ファミリーがタンパク質キナーゼ酵素ファミリーである。現在、約 5 0 0 の異なるタンパク質キナーゼが知られている。タンパク質キナーゼには、A T P - M g ²⁺ 複合体の - リン酸を上記アミノ酸側鎖へ転移することにより各種タンパク質のアミノ酸側鎖のリン酸化を触媒する働きがある。この酵素は、細胞内の大部分のシグナル伝達プロセスを制御することにより、タンパク質のセリン、スレオニンおよびチロシン残基のヒドロキシル基の可逆的なリン酸化を介して細胞の機能、成長、分化および破壊（アポトーシス）を支配する。タンパク質キナーゼがシグナル伝達、転写調節、細胞運動性および細胞分裂を含めた数多くの細胞機能の鍵となる制御因子であることが研究により示されている。またいくつかの癌遺伝子がタンパク質キナーゼをコードすることも示されており

50

、このことはキナーゼが腫瘍形成において役割を果たしていることを示唆する。こうしたプロセスは多くの場合、各キナーゼ自体が1つ以上のキナーゼにより調節される互いに複雑に絡み合った経路により高度に統制されている。その結果、異常なまたは不適当なタンパク質キナーゼ活性が、良性および悪性の増殖性疾患ならびに免疫および神経系の不適当な活性化に起因する疾患を含め、このような異常なキナーゼ活性に関連した病的状態の発生に寄与している可能性がある。タンパク質キナーゼは、その生理的関連性、多様性および普遍性により、生化学的および医学的研究において最も重要でありかつ広く研究されている酵素ファミリーの1つとなっている。

【0004】

酵素のタンパク質キナーゼファミリーは通常、それがリン酸化するアミノ酸残基に基づいて、タンパク質チロシンキナーゼおよびタンパク質セリン/スレオニンキナーゼの2つの大きなサブファミリーに分類される。タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ(PSTK)には、環状AMP依存性および環状GMP依存性タンパク質キナーゼ、カルシウム/リン脂質依存性タンパク質キナーゼ、カルシウム依存性およびカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ、カゼインキナーゼ、細胞分裂サイクルタンパク質キナーゼなどがある。これらのキナーゼは通常、恐らくアンカリングタンパク質により、細胞質内にあるかまたは粒子状の細胞断片に付随している。異常なタンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性が、数多くの病態、例えば関節リウマチ、乾癬、敗血症性ショック、骨喪失、多くの癌およびその他の増殖性疾患などに関連付けられているか、またはそれらにおいて疑われる。したがって、セリン/スレオニンキナーゼおよびそれが一部となっているシグナル伝達経路は、薬物設計の重要な標的である。チロシンキナーゼはチロシン残基をリン酸化する。チロシンキナーゼは、細胞調節において同じく重要な役割を果たす。このキナーゼは、上皮成長因子受容体、インスリン受容体、血小板由来増殖因子受容体などを含めた、増殖因子およびホルモン分子のような分子に対するいくつかの受容体を含む。多くのチロシンキナーゼが、その受容体ドメインが細胞の外側に、またキナーゼドメインが細胞の内側に位置する膜貫通型タンパク質であるということが研究で示されている。同様にチロシンキナーゼのモジュレーターを同定するための数多くの研究が進行中である。

【0005】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)キナーゼ/細胞外シグナル関連キナーゼ(EK)キナーゼ(以下、MEKと呼ぶ)は、数多くの細胞プロセスの調節に参与することが知られている。Rafファミリー(B-Raf、C-Rafなど)はMEKファミリー(MEK-1、MEK-2など)活性化し、MEKファミリーはEKファミリー(EK-1およびEK-2)を活性化する。大まかには、RAF/MEK/EK経路のシグナル伝達活性はmRNA翻訳を制御する。これには細胞周期に関連する遺伝子が含まれる。したがって、この経路の過剰活性化は、無制御な細胞増殖を引き起こし得る。ヒト悪性腫瘍全体の約30%でEK過剰活性化によるRAF/MEK/EK経路の調節解除が見られる(Allen, L.F.ら, Semin. Oncol. 2003. 30(5 Suppl 16): 105-16)。活性化BRAf変異が特定の腫瘍タイプ(例えば、黒色腫)において高頻度で確認されている(Davies, H.ら, Nature. 2002. 417: 949-54)。ヒト癌に発生する確認済みの全BRAf変異の約90%は、V600E/D/K(T1799A)アミノ酸置換を生じるエクソン15のT1799塩基転換変異である(Wellbrock, C.ら, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004. 5: 875-85; Wan, P.T.ら, Cell. 2004. 116: 855-67)。この変異は、調節リン酸化を模倣し、BRAf活性を野生型に比べて約10倍増加させられると思われる(Davies, H.ら, Nature. 2002. 417: 949-54)。この活性化変異の頻度およびそれが引き起こす経路依存ゆえに、BRAfは極めて魅力的な標的である。

【0006】

ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)経路は、ヒト癌において最も活性化されることが多い経路である。腫瘍形成および腫瘍進行におけるこの経路の機能および重要性は

10

20

30

40

50

十分に立証されている (Samuels および Ericson, Curr. Opin. Oncology, 2006, 18: 77 - 82)。PI3K - AKT シグナル伝達は、細胞の生存、増殖および代謝の極めて重要なモジュレーターであると思われる。これには、PI3K タンパク質ファミリーのメンバーであり細胞増殖および翻訳の直接的な調節因子である哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR) の活性化が含まれる。したがって、腫瘍における PI3K / AKT / mTOR シグナル伝達の調節解除は、無制限な生殖能およびアポトーシスの回避を含めた悪性腫瘍の数多くの顕著な特徴を示す細胞表現型に寄与する (Hanahan および Weinberg, Cell, 2000, 100: 57 - 70)。

【0007】

PI3K ファミリーは、特にそのキナーゼドメイン内に配列相同性を共有する 15 種類のタンパク質から構成されるが、それぞれ基質特異性および調節方法が異なる (Vivanco および Sawyers, Nat. Rev. Cancer, 2002, 2: 489 - 501)。クラス I の PI3 - キナーゼは、ホスファチジルイノシトール (PtdIns) として知られるイノシトール含有脂質を 3 位でリン酸化する。クラス I ファミリーメンバーの主要な基質である PtdIns - 4, 5 - P2 (PIP2) は、このキナーゼにより PtdIns - 3, 4, 5 - P3 (PIP3) へ変換される。PIP3 はプレクストリン相同ドメインを含むタンパク質を細胞膜に動員する重要なセカンドメッセンジャーであり、動員されたタンパク質はそこで活性化される。このようなタンパク質うち最もよく研究されているのは、細胞の生存、成長および増殖を促進する AKT である。AKT は、活性化されると細胞質および核まで移動し、そこで mTOR (TORC1) を含めた数多くの基質を活性化する。AKT に加え、PI3K が PDK1、CDC42 および RAC1 のような発癌に関与する他の経路を活性化する (Samuels および Ericson, Curr. Opin. Oncology, 2006, 18: 77 - 82)。

【0008】

ヒト腫瘍の研究では、数多くの機序を介して PI3K / AKT / mTOR シグナル伝達経路の活性化が生じ得る。この経路の遺伝的調節解除は一般的なものであり、数多くの方法で生じ得る (Samuels および Ericson, Curr. Opin. Oncology, 2006, 18: 77 - 82 で概説されている)。PIK3CA 遺伝子 (PI3K の p110 触媒サブユニットをコードする) の活性化変異は、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌および結腸直腸癌を含めたヒト腫瘍のかなりの割合において生じる。またこの遺伝子の活性化 DNA 増幅も、多くの異なる腫瘍タイプにおいてこれより低い頻度で生じる。PI3K (PIK3R1) の p85 調節サブユニットの変異は、PIK3R1 と PIK3CA の間の C2 - iSH2 相互作用を破綻させると考えられており、卵巣癌、膠芽腫および結腸直腸癌において生じる。腫瘍抑制因子 PTEN は、PIP3 を脱リン酸化して PIP2 を生成することにより PI3K 経路の阻害因子として作用し、一般に変異しているか、欠失しているか、または後成的に発現抑制されている。最後にこの経路は、AKT の DNA 増幅または変異により PI3K の下流でも遺伝的に活性化され得るが、このような遺伝的事象がヒト癌で生じることはかなり少ない。PI3K アイソフォーム、特に PI3K の阻害が癌治療において有用であることが知られている (例えば、国際公開第 05 / 121142 号、同第 08 / 144463 号、同第 08 / 144464 号、同第 07 / 136940 号を参照されたい)。

【0009】

癌の影響に苦しむ患者のより効果的なおよび / または強化された治療を提供する新規な単独療法または併用療法を提供することが有用であると思われる。

【発明の概要】

【0010】

本発明の一実施形態では、

(i) 構造 (I) の化合物 N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1, 1 - ジメチルエチル) - 1, 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル }

10

20

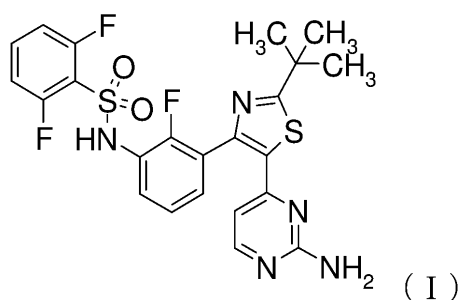
30

40

50

- 2, 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミド (以下、化合物 A) :

【化 1】

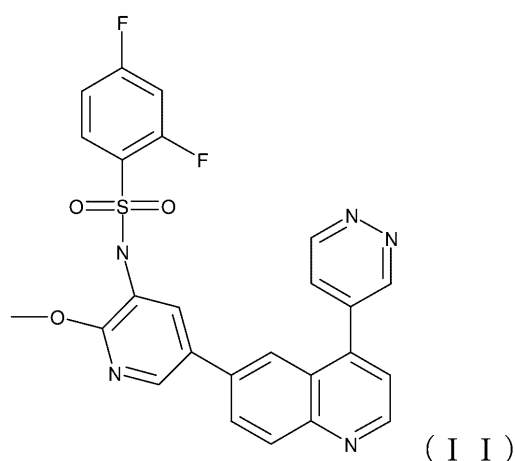


10

またはその薬学的に許容される塩と、

(i i) 構造 (I I) の化合物 2, 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミド (以下、化合物 B) :

【化 2】



20

またはその薬学的に許容される塩とを含んでなる組合せが提供される。

30

【 0 0 1 1 】

本発明の一実施形態では、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法が提供され、この方法は、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、化合物 B またはその薬学的に許容される塩との組合せの治療有効量を、上記ヒトへ *in vivo* 投与することを含んでなる。

【 0 0 1 2 】

本発明の一実施形態では、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法が提供され、この方法は、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、化合物 B またはその薬学的に許容される塩との組合せの治療有効量を、上記ヒトへ *in vivo* 投与することを含んでなる、この組合せは一定期間内に投与され、かつこの組合せは継続期間の間投与される。

40

【 0 0 1 3 】

本発明の一実施形態では、治療を必要とするヒトにおける癌の治療法が提供され、この方法は、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、化合物 B またはその薬学的に許容される塩との組合せの治療有効量を、上記ヒトへ *in vivo* 投与することを含んでなる、化合物 A および B は連続投与される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】

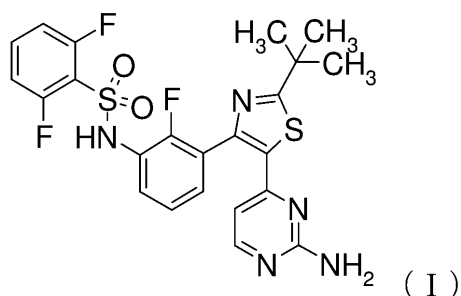
【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 5 】

50

本発明は、抗増殖性活性を示す組合せに関する。好ましくは、この方法は、構造 I :

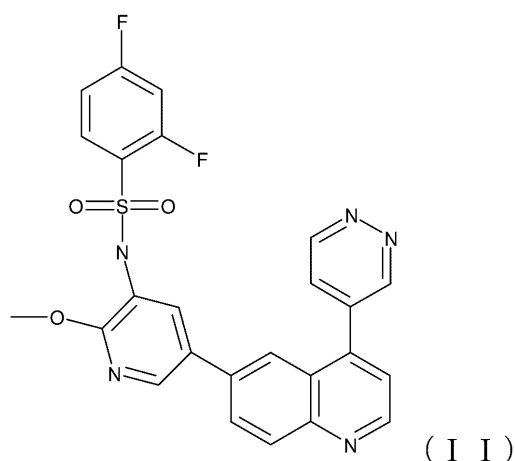
【化 3】



10

により表される N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミド (化合物 A) またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物、好ましくはジメチルスルホキシド溶媒和物と、以下の構造 :

【化 4】



20

により表される 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミド (化合物 B) またはその薬学的に許容される塩との共投与による癌の治療法に関する。

30

【 0 0 1 6 】

化合物 A はその薬学的に許容される塩と共に、特に癌治療における B - R a f 活性の阻害剤として有用なものとして、国際出願日が 2 0 0 9 年 5 月 4 日、国際公開番号が国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 7 3 9 1 号および国際公開日が国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 7 3 9 1 号である国際出願 P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 2 6 8 2 号で開示およびクレームされており、上記明細書は全開示が参照により本明細書に組み込まれ、化合物 A は実施例 5 8 の化合物である。化合物 A は、国際出願 P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 2 6 8 2 号に記載されている通りに調製することができる。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、化合物 A はメタンスルホン酸塩の形態である。この塩形態は、国際出願日が 2 0 0 9 年 5 月 4 日である国際出願 P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 2 6 8 2 号の記載から当業者により調製され得る。

40

【 0 0 1 8 】

化合物 B はその薬学的に許容される塩と共に、特に癌治療における P I 3 K 活性の阻害剤として有用なものとして、国際出願日が 2 0 0 8 年 5 月 1 6 日、国際公開番号が国際公開第 2 0 0 8 / 1 4 4 4 4 6 3 号および国際公開日が 2 0 0 8 年 1 1 月 2 7 日である国際出願 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 6 3 8 1 9 号で開示およびクレームされており、上記明細書は全開示が参照により本明細書に組み込まれ、化合物 B は実施例 3 4 5 の化合物である。化合物 B は、国際出願 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 6 3 8 1 9 号に記載されている通りに

50

調製することができる。

【0019】

好ましくは、化合物 B は遊離塩基の形態である。

【0020】

治療有効量の本発明の組合せの投与は、この組合せが治療有効量の成分化合物の個々の投与と比較して、次の1つ以上の改善された特性：i) 最も活性な単一薬剤よりも強い抗癌作用、ii) 相乗的もしくは非常に相乗的な抗癌活性、iii) 抗癌活性が増強され副作用が減少したプロファイルをもたらす投与プロトコル、iv) 毒性作用プロファイルの減少、v) 治療域の増加またはvi) 一方もしくは両方の成分化合物のバイオアベイラビリティの増加をもたらすという点で、個々の成分化合物よりも有利である。

10

【0021】

本発明の化合物は、溶質（本発明では、化合物 A もしくはその塩および / または化合物 B もしくはその塩）と溶媒により形成される可変的な化学量論組成の複合体であることが理解される溶媒和物を形成し得る。本発明の目的のための上記溶媒は、溶質の生物学的活性に干渉し得ない。適当な溶媒の例としては、水、メタノール、ジメチルスルホキシド、エタノールおよび酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、使用する溶媒は薬学的に許容される溶媒である。適当な薬学的に許容される溶媒和物としては、水、ジメチルスルホキシド、エタノールおよび酢酸が非限定的に挙げられる。好ましくは、使用する溶媒は水である。

20

【0022】

本発明の化合物の薬学的に許容される塩は、当業者により容易に調製される。

【0023】

また、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物および / あるいは化合物 B またはその薬学的に許容される塩をプロドラッグとして投与する、本発明の組合せを用いた癌の治療法も本明細書において考慮される。本発明の化合物の薬学的に許容されるプロドラッグは当業者により容易に調製される。

【0024】

投与プロトコルに言及する場合、用語「日」、「1日当たり」などは、午前零時に始まり翌午前零時に終わる1暦日以内の時間を指す。

【0025】

本明細書で使用される用語「治療すること」およびその派生語は、治療的治療を意味する。特定の状態に関しては、治療することは：(1) 状態の1つ以上の生物学的兆候の状態を改善するまたは防ぐこと、(2) (a) 状態を引き起こすもしくは状態に関与する生物学的カスケードの1つ以上の地点または (b) 状態の1つ以上の生物学的兆候に干渉すること、(3) 状態またはその治療に関連した1つ以上の症状、作用または副作用を軽減すること、あるいは (4) 状態または状態の1つ以上の生物学的兆候の進行を遅らせることを意味する。予防的治療もこれにより考慮される。当業者は「予防」が絶対的な用語ではないことを理解するであろう。医学では、「予防」は、状態もしくはその生物学的兆候の可能性もしくは重症度を実質的に減少させるための、またはその状態もしくはその生物学的兆候の発症を遅延させるための薬物の予防的投与を指すものであると理解されている。予防的治療は、例えば、対象が癌を発症する危険性が高いと考えられる場合、例えば、対象が癌の強い家族歴を有する場合、または対象が癌原性物質に曝露されている場合などに適切である

30

40

【0026】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、例えば研究者または臨床医の求める組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的反応を誘発する薬物または医薬品の量を意味する。さらに「治療有効量」という用語は、その量を投与されていない対応する対象と比べて、疾患、障害もしくは副作用の治療の向上、治癒、予防もしくは改善または疾患もしくは障害の進行速度の低下をもたらす任意の量を意味する。またこの用語は、正常な生理機能を増強するのに効果的な量もその範囲に包含する。

50

【 0 0 2 7 】

「定期的投与」という用語またはその派生語は、休薬日を設けて薬物をヒトへ投与することを意味する。休薬日（休薬期間（drug vacation、medication vacation））、計画的治療中断または戦略的治療中断と呼ばれることもある）とは、数日から数ヶ月の範囲の期間、患者への薬物（1つまたは複数）の投与を中止する日のことである。

【 0 0 2 8 】

「組合せ」という用語およびその派生語は、治療有効量の化合物 A またはその薬学的に許容される塩および化合物 B またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物の、同時投与または任意の方式による別々の連続投与を意味する。投与が同時でない場合、互いにごく近接した時間に化合物を投与することが好ましい。さらに、化合物を同じ剤形で投与するかどうかは関係なく、例えば、一方の化合物を局所投与し、もう一方の化合物を経口投与し得る。好ましくは両化合物を経口投与する。

10

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用される「組合せキット」という用語は、本発明に従って、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物および化合物 B またはその薬学的に許容される塩を投与するために使用する、1つまたは複数の医薬組成物を意味する。両化合物を同時に投与する場合、組合せキットは、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物および化合物 B またはその薬学的に許容される塩を、錠剤のような単一の医薬組成物中または別個の医薬組成物中に含有し得る。化合物を同時に投与しない場合、組合せキットは、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物および化合物 B またはその薬学的に許容される塩を、別個の医薬組成物中に含有する。組合せキットは、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物および化合物 B またはその薬学的に許容される塩を、単一の包装中の別個の医薬組成物中に、または別個の包装中の別個の医薬組成物中に含んでなる。

20

【 0 0 3 0 】

一態様では、構成成分：薬学的に許容される担体を伴う化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物；および薬学的に許容される担体を伴う化合物 B またはその薬学的に許容される塩を含んでなる組合せキットが提供される。

【 0 0 3 1 】

本発明の一実施形態では、組合せキットは、構成成分：薬学的に許容される担体を伴う化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物；および薬学的に許容される担体を伴う化合物 B またはその薬学的に許容される塩を含んでなる、構成成分は連続、個別および/または同時投与に適した形態で提供される。

30

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、組合せキットは、薬学的に許容される担体を伴う化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含んでなる第一の容器；および薬学的に許容される担体を伴う化合物 B またはその薬学的に許容される塩を含んでなる第二の容器；ならびに前記第一および第二の容器を入れるための容器手段を含んでなる。

【 0 0 3 3 】

また「組合せキット」は、用法・用量指示のような指示に従って提供され得る。このような用法・用量指示は、例えば製剤ラベルにより医師へ提供されるものであるか、または患者への指示のように医師により提供されるものであり得る。

40

【 0 0 3 4 】

別途定義されない限り、本明細書に記載のすべての投与プロトコールにおいて、投与する化合物のレジメンは、治療の開始と共に始まり治療の終わりに終了する必要はなく、両化合物を投与する連続日数および任意選択で一方の成分化合物だけを投与する連続日数、または投与する化合物の量を含む指示された投与プロトコールが、治療過程で同じ時点にあることのみが必要とされる。

【 0 0 3 5 】

50

本明細書で使用される「化合物 A²」という用語は、化合物 A またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を意味する。

【0036】

本明細書で使用される「化合物 B²」という用語は、化合物 B またはその薬学的に許容される塩を意味する。

【0037】

好ましくは、本発明の組合せは「一定期間」内に投与する。

【0038】

本明細書で使用される「一定期間」という用語およびその派生語は、化合物 A² および化合物 B² のうちの一方と化合物 A² および化合物 B² のうちの他方の投与間の時間間隔を意味する。別途定義されない限り、一定期間は同時投与を含み得る。本発明の両化合物を 1 日 1 回投与する場合、一定期間は、1 日の間の化合物 A² および化合物 B² の投与を指す。本発明の化合物の一方または両方を 1 日 2 回以上投与する場合、特定日の各化合物の最初の投与に基づいて一定期間を計算する。一定期間を計算する際には、特定日における本発明の化合物の最初の投与後の投与はすべて考慮しない。

10

【0039】

化合物を「一定期間」内に投与しかつ同時に投与しない場合、好ましくは、両化合物を互いに約 2 4 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 2 4 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 1 2 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 1 2 時間であるであり；好ましくは、両化合物を互いに約 1 1 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 1 1 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 1 0 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 1 0 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 9 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 9 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 8 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 8 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 7 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 7 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 6 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 6 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 5 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 5 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 4 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 4 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 3 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 3 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 2 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 2 時間であり；好ましくは、両化合物を互いに約 1 時間以内に投与し、この場合、一定期間は約 1 時間である。本明細書で使用される場合、約 4 5 分未満の間隔での化合物 A² と化合物 B² の投与は同時投与と見なされる。

20

30

【0040】

本発明の組合せを「一定期間」投与する場合、好ましくは、化合物を「継続期間の間」の間、共投与する。

【0041】

本明細書で使用される「継続期間の間」という用語およびその派生語は、示される連続日数の間、本発明の両化合物を投与することを意味する。

【0042】

40

「一定期間」投与に関して：

好ましくは、少なくとも 1 日間、両化合物を一定期間内に投与し、この場合、継続期間の間は少なくとも 1 日であり；好ましくは、治療過程において、少なくとも 3 日間連続で両化合物を一定期間内に投与し、この場合、継続期間の間は少なくとも 3 日であり；好ましくは、治療過程において、少なくとも 5 日間連続で両化合物を一定期間内に投与し、この場合、継続期間の間は少なくとも 5 日であり；好ましくは、治療過程において、少なくとも 7 日間連続で両化合物を一定期間内に投与し、この場合、継続期間の間は少なくとも 7 日であり；好ましくは、治療過程において、少なくとも 1 4 日間連続で両化合物を一定期間内に投与し、この場合、継続期間の間は少なくとも 1 4 日であり；好ましくは、治療過程において、少なくとも 3 0 日間連続で両化合物を一定期間内に投与し、この場合、継

50

続期間の間は少なくとも30日である。

【0043】

化合物を「一定期間」の間に投与しない場合、好ましくは、化合物を連続投与する。本明細書で使用される「連続投与」という用語およびその派生語は、化合物A²および化合物B²のうちの一方を1日1回、1日間以上連続して投与し、続いて化合物A²および化合物B²のうちの他方を1日1回、2日間以上連続して投与することを意味する。また、化合物A²および化合物B²のうちの一方と化合物A²および化合物B²のうちの他方の連続投与の間に適用される休薬日も本明細書において考慮される。本明細書で使用される休薬日とは、化合物A²および化合物B²のうちの一方の連続投与後ならびに化合物A²および化合物B²のうちの他方の投与前であって、化合物A²も化合物B²も投与しない日数の期間のことである。好ましくは、休薬日は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日および14日から選択される日数の期間である。

10

【0044】

連続投与に関して：

好ましくは、化合物A²および化合物B²のうちの一方を2～30日間連続で投与し、これに任意選択の休薬日が続き、次いで化合物A²および化合物B²のうちの他方を2～30日間連続で投与する。好ましくは、化合物A²および化合物B²のうちの一方を2～21日間連続で投与し、これに任意選択の休薬日が続き、次いで化合物A²および化合物B²のうちの他方を2～21日間連続で投与する。好ましくは、化合物A²および化合物B²のうちの一方を2～14日間連続で投与し、これに1～14日間の休薬日が続き、次いで化合物A²および化合物B²のうちの他方を2～14日間連続で投与する。好ましくは、化合物A²および化合物B²のうちの一方を3～7日間連続で投与し、これに3～10日間の休薬日が続き、次いで化合物A²および化合物B²のうちの他方を3～7日間連続で投与する。

20

【0045】

好ましくは、化合物B²を順序の最初に投与し、これに任意選択の休薬日が続き、次いで化合物A²を投与する。好ましくは、化合物B²を3～21日間連続で投与し、これに任意選択の休薬日が続き、次いで化合物A²を3～21日間連続で投与する。好ましくは、化合物B²を3～21日間連続で投与し、これに1～14日間の休薬日が続き、次いで化合物A²を3～21日間連続で投与する。好ましくは、化合物B²を3～21日間連続で投与し、これに3～14日間の休薬日が続き、次いで化合物A²を3～21日間連続で投与する。好ましくは、化合物B²を21日間連続で投与し、これに任意選択の休薬日が続き、次いで化合物A²を14日間連続で投与する。好ましくは、化合物B²を14日間連続で投与し、これに1～14日間の休薬日が続き、次いで化合物A²を14日間連続で投与する。好ましくは、化合物B²を7日間連続で投与し、これに3～10日間の休薬日が続き、次いで化合物A²を7日間連続で投与する。好ましくは、化合物B²を3日間連続で投与し、これに3～14日間の休薬日が続き、次いで化合物A²を7日間連続で投与する。好ましくは、化合物B²を3日間連続で投与し、これに3～10日間の休薬日が続き、次いで化合物A²を3日間連続で投与する。

30

40

【0046】

「一定期間」投与および「連続」投与の後に、反復投与が続くかまたは交互投与プロトコールが続いてもよく、また休薬日が反復投与または交互投与プロトコールに先行してもよいことが理解される。

【0047】

好ましくは、本発明による組合せの一部として投与される化合物A²の量は、約10mg～約300mgから選択される量であり；好ましくは、その量は約30mg～約280mgから選択され；好ましくは、その量は約40mg～約260mgから選択され；好ましくは、その量は約60mg～約240mgから選択され；好ましくは、その量は約80mg～約220mgから選択され；好ましくは、その量は約90mg～約210mgから

50

選択され；好ましくは、その量は約 100 mg ~ 約 200 mg から選択され、好ましくは、その量は約 110 mg ~ 約 190 mg から選択され、好ましくは、その量は約 120 mg ~ 約 180 mg から選択され、好ましくは、その量は約 130 mg ~ 約 170 mg から選択され、好ましくは、その量は約 140 mg ~ 約 160 mg から選択され、好ましくは、その量は 150 mg である。したがって、本発明による組合せの一部として投与される化合物 A² の量は、約 10 mg ~ 約 300 mg から選択される量である。例えば、本発明による組合せの一部として投与される化合物 A² の量は、好ましくは、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、85 mg、90 mg、95 mg、100 mg、105 mg、110 mg、115 mg、120 mg、125 mg、130 mg、135 mg、140 mg、145 mg、150 mg、155 mg、160 mg、165 mg、170 mg、175 mg、180 mg、185 mg、190 mg、195 mg、200 mg、205 mg、210 mg、215 mg、220 mg、225 mg、230 mg、235 mg、240 mg、245 mg、250 mg、255 mg、260 mg、265 mg、270 mg、275 mg、280 mg、285 mg、290 mg、295 mg および 300 mg から選択される。好ましくは、選択された量の化合物 A² を 1 日 1 ~ 4 回投与する。好ましくは、選択された量の化合物 A² を 1 日 2 回投与する。好ましくは、選択された量の化合物 A² を 1 日 1 回投与する。好ましくは、化合物 A² の投与を負荷投与として開始する。好ましくは、負荷投与は維持投与の 2 ~ 100 倍；好ましくは 2 ~ 10 倍；好ましくは 2 ~ 5 倍；好ましくは 2 倍；好ましくは 3 倍；好ましくは 4 倍；好ましくは 5 倍の量である。好ましくは、負荷投与を 1 ~ 7 日間；好ましくは 1 ~ 5 日間；好ましくは 1 ~ 3 日間；好ましくは 1 日間；好ましくは 2 日間；好ましくは 3 日間行い、これに維持投与プロトコルが続く。

【0048】

好ましくは、本発明による組合せの一部として投与される化合物 B² の量は、約 0.25 mg ~ 約 75 mg から選択される量であり；好ましくは、その量は約 0.5 mg ~ 約 50 mg から選択され；好ましくは、その量は約 1 mg ~ 約 25 mg から選択され；好ましくは、その量は約 2 mg ~ 約 20 mg から選択され；好ましくは、その量は約 4 mg ~ 約 16 mg から選択され；好ましくは、その量は約 6 mg ~ 約 12 mg から選択され；好ましくは、その量は約 10 mg である。したがって、本発明による組合せの一部として投与される化合物 B² の量は、約 0.5 mg ~ 約 50 mg から選択される量である。例えば、本発明による組合せの一部として投与される化合物 B² の量は、0.5 mg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg、16 mg、17 mg、18 mg、20 mg、21 mg、22 mg、23 mg、25 mg、26 mg、27 mg、28 mg、29 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg または 50 mg であり得る。

【0049】

本明細書で使用される場合、化合物 A² および化合物 B² に関して明示される量はすべて、1 用量当たりの遊離または非塩および非溶媒和化合物の投与量として示される。

【0050】

また本発明の方法は、癌治療の他の治療法と共に用いてもよい。

【0051】

治療での使用において、治療有効量の本発明の組合せを粗化学物質として投与し得るが、1 つまたは複数の医薬組成物として組合せを提供することが好ましい。したがって本発明は、化合物 A² および / または化合物 B² ならびに 1 つ以上の薬学的に許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。本発明の組合せは上記の通りである。担体（1 つまたは複数）は、製剤の他の成分と適合性がある、医薬製剤化が可能であるおよびその被投与者に対して有害でないという意味で許容されるものでなければならない。本発明の別の態様によれば、化合物 A² および / または化合物 B² を 1 つ以上の薬学的に許容される担体と混和することを含めた、医薬製剤を調製するための工程も提供される。前述の通り、使用される薬剤の組合せの上記成分は、別個の医薬組成物として、または 1 つの医薬製剤

中に一緒に製剤化して提供し得る。

【0052】

医薬製剤は、単位用量当たり所定量の有効成分を含有する単位用量形態で提供し得る。当業者に公知のように、1用量あたりの有効成分の量は、治療される状態、投与経路ならびに患者の年齢、体重および状態によって決まる。好適な単位用量剤形は、1日の投与量もしくはサブ用量またはその適当な割合の有効成分を含有するものである。さらに、このような医薬製剤は、薬学技術分野で公知の任意の方法により調製し得る。

【0053】

化合物 A² および化合物 B² は任意の適当な経路で投与し得る。適当な経路としては、経口、直腸内、経鼻、局所（パッカルおよび舌下を含む）、腔内および非経口（皮下、筋肉内、静脈内、真皮内、髄腔内および硬膜外を含む）が挙げられる。好適な経路は、例えば組合せの被投与者の状態および治療する癌に応じて異なり得ることが理解されるであろう。また、投与される各薬剤を同じまたは異なる経路で投与し得ること、および化合物 A² と化合物 B² を1つの医薬組成物/製剤中に混合し得ることも理解されるであろう。

10

【0054】

本発明の化合物または組合せをカプセル剤、錠剤または注射用製剤のような都合のよい剤形内に組み込む。固体または液体の医薬担体を用いる。固体担体としては、デンプン、ラクトース、硫酸カルシウム二水和物、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウムおよびステアリン酸が挙げられる。液体担体としては、シロップ、ラッカセイ油、オリーブ油、生理食塩水および水が挙げられる。同様に担体として、持効性放出の材料、例えば単独のモノステアリン酸グリセリルもしくはジステアリン酸グリセリルまたはそれにロウを加えたものなどを挙げ得る。固体担体の量は様々であるが、好ましくは、投与単位当たり約 25 mg ~ 約 1 g である。液体担体を使用する場合、製剤は好ましくは、シロップ剤、エリキシル剤、乳剤、軟ゼラチンカプセル剤、アンプルのような滅菌注射溶液剤または水性もしくは非水性液体懸濁液剤の形態である。

20

【0055】

例えば、錠剤またはカプセル形態での経口投与では、有効薬物成分を経口用で非毒性の薬学的に許容される不活性担体、例えばエタノール、グリセロール、水などと組み合わせ得る。化合物を微細なサイズに粉碎し、同様に粉碎した食用炭水化物、例えばデンプンまたはマンニトールのような医薬担体と混合することにより、粉末剤を調製する。香味料、保存剤、分散剤および着色剤も提供し得る。

30

【0056】

製剤のタイプを考慮して、上記成分の他にも当該技術分野における通常の他の薬剤を製剤に含ませ得る、例えば、経口投与に適した製剤に着色剤を含ませ得るということを理解するべきである。

【0057】

適応があれば、治療有効量の本発明の組合せ（化合物 B² と組み合わせた化合物 A²）をヒトに投与する。通常、投与される本発明の薬剤の治療有効量は、例えば、対象の年齢および体重、治療を必要とする正確な状態、状態の重症度、製剤の性質および投与経路を含めた数多くの因子によって決まる。最終的には、治療有効量は主治医が判断する。

40

【0058】

本発明の組合せを有効性、有利性および相乗性に関して既知の方法により試験する。好ましくは、本発明の組合せを有効性、有利性および相乗性に関して、一般的には以下の併用細胞増殖アッセイにより試験する。10% FBS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した、各細胞型に適した培地中、細胞を 96 または 384 ウェルプレートに播種し、37℃、5% CO₂ で一晩インキュベートする。細胞を化合物 A² の希釈物（化合物を含有しないものを含む、0.50 ~ 10 μM を始点とする 3 倍希釈による 10 種類の希釈物）で格子状に処置し、また化合物 B²（化合物を含有しないものを含む、0.10 ~ 1.0 μM を始点とする 3 倍希釈による 10 種類の希釈物）でも処置し、さらに 72

50

時間、上記のようにインキュベートする。場合によっては化合物を千鳥状に添加し、インキュベーションを7日まで延長し得る。製造者プロトコルに従いCell Titer - Glo (登録商標) 試薬を用いて細胞増殖を測定し、0.5秒読取りの発光モードに設定したPerkinElmer EnVision (商標) リーダーセットでシグナルを読み取る。データを下記のように解析する。

【0059】

結果を $t = 0$ 値の百分率として表し、化合物(1つまたは複数)濃度に対してプロットする。 $t = 0$ 値は100%に対して正規化されており、化合物添加の時点で存在する細胞数を表す。Microsoft ExcelソフトウェアにIDBS XLFitプラグインを使用して細胞生存率の濃度に対する4パラメーター曲線フィット法を用いて、細胞増殖の50%阻害に必要な濃度(GI_{50})を決定し、各化合物および/または化合物の組合せに対する細胞反応を判定する。細胞を含まないウェルの値を差し引いてバックグラウンド補正を行う。薬剤の各組合せに関して、併用指数(CI)、Excess Over Highest Single Agent (EOHSA)およびExcess Over Bliss (EOBliss)を、ChouおよびTalalay (1984) Advances in Enzyme Regulation, 22, 37-55; ならびにBerenbaum, MC (1981) Adv. Cancer Research, 35, 269-335に記載の既知の方法に従って算出する。

10

【0060】

本発明の組合せは、上記アッセイにおいて有効であるため、癌治療において有利な治療的有用性を示す。

20

【0061】

好ましくは本発明は、脳癌(神経膠腫)、膠芽腫、星状細胞腫、多形神経膠芽腫、パナヤン・ゾナナ症候群、カウデン病、レルミット・デュークロス病、乳癌、炎症性乳癌、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上衣腫、髄芽腫、結腸癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺癌、肝臓癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肉腫、骨肉腫、骨巨細胞腫、甲状腺癌、リンパ芽球性T細胞白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性好中球性白血病、急性リンパ芽球性T細胞白血病、形質細胞腫、免疫芽球性大細胞白血病、マントル細胞白血病、多発性骨髄腫巨核芽球性白血病、多発性骨髄腫、急性巨核球性白血病、前骨髄球性白血病、赤白血病、悪性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、リンパ芽球性T細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、神経芽腫、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、外陰癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、中皮腫、食道癌、唾液腺癌、肝細胞癌、胃癌、鼻咽頭癌、頬癌、口腔癌、GIST(消化管間質腫瘍)および精巣癌から選択される癌を治療するまたはその重症度を低減するための方法に関する。

30

【0062】

好ましくは本発明は、脳癌(神経膠腫)、膠芽腫、パナヤン・ゾナナ症候群、カウデン病、レルミット・デュークロス病、乳癌、結腸癌、頭頸部癌、腎臓、肺癌、肝臓癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肉腫および甲状腺癌から選択される癌を治療するまたはその重症度を軽減するための方法に関する。

40

【0063】

好ましくは本発明は、卵巣癌、乳癌、膵臓癌および前立腺癌から選択される癌を治療するまたはその重症度を軽減するための方法に関する。

【0064】

好ましくは本発明は、肺癌、膵臓癌および結腸癌から選択される癌を治療するまたはその重症度を軽減するための方法に関する。

【0065】

好ましくは本発明は、特定のバイオマーカー(1つまたは複数)が野生型または変異型である癌を治療するまたはその重症度を軽減するための方法に関する。

【0066】

50

好ましくは本発明は、R a f が野生型または変異型であり、P I 3 K / P t e n が野生型または変異型である癌を治療するまたはその重症度を軽減するための方法に関する。R a f および P I 3 K / P T E N が共に野生型である患者、R a f および P I 3 K / P T E N が共に変異型である患者、R a f が変異型であり P I 3 K / P T E N が野生型である患者、ならびに R a f が野生型であり P I 3 K / P T E N が変異型である患者がこれに含まれる。

【0067】

当該技術分野において理解されている「野生型」という用語は、遺伝子改変されていない天然の集団内に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列を指す。同様に当該技術分野において理解されている「変異型」は、それぞれ野生型のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに見られる対応するアミノ酸または核酸に対して、少なくとも1つの改変を有するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列を包含する。変異型という用語には、最も一般的に見られる（野生型の）核酸鎖との比較で一塩基対の差異が核酸鎖の配列内に存在する一塩基多型（S N P）が包含される。

【0068】

特定のバイオマーカー（1つまたは複数）が野生型または変異型であり、P I 3 K / P t e n が野生型または変異型である癌は、既知の方法により同定される。

【0069】

例えば、DNA増幅および配列決定技術、特に限定されないが、それぞれノーザンブロット法およびサザンブロット法を含めたDNAおよびRNA検出技術、ならびに/または各種のバイオチップおよびアレイ技術により、野生型または変異型のR a f またはP I 3 K / P T E N 腫瘍細胞を同定することができる。特に限定されないが、E L I S A、ウエスタンブロット法または免疫細胞化学のような免疫診断技術を含めた各種技術により、野生型および変異体ポリペプチドを検出することができる。好ましくは、加ピロリン酸分解活性化重合（P A P）および/またはP C R法を使用し得る。L i u, Qら, H u m a n M u t a t i o n 23:426-436(2004)。

【0070】

本発明は、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩とを含んでなる組合せを提供する。

【0071】

また本発明は、治療で使用するための、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩とを含んでなる組合せも提供する。

【0072】

また本発明は、癌治療で使用するための、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩とを含んでなる組合せも提供する。

【0073】

また本発明は、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6

10

20

30

40

50

- ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2, 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩との組合せを含んでなる医薬組成物も提供する。

【 0 0 7 4 】

また本発明は、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2, 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩とを含んでなる組合せキットも提供する。

10

【 0 0 7 5 】

また本発明は、薬剤の製造における、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2, 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩とを含んでなる組合せの使用も提供する。

【 0 0 7 6 】

また本発明は、癌を治療するための薬剤製造における、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2, 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩とを含んでなる組合せの使用も提供する。

20

【 0 0 7 7 】

また本発明は、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、2, 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドまたはその薬学的に許容される塩との組合せを、治療を必要とする対象に投与することを含んでなる、癌の治療法も提供する。

30

【 0 0 7 8 】

以下の実施例は、単に説明を目的としたものであり、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【 実施例 】

【 0 0 7 9 】

実験の詳細

40

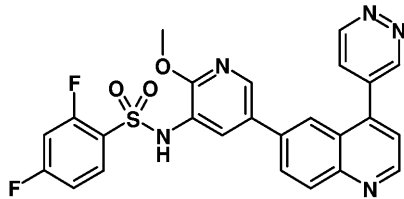
N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミド (化合物 A) がその薬学的に許容される塩と共に、特に癌治療において B - R a f 活性阻害剤として有用であるとして、国際出願日が 2 0 0 9 年 5 月 4 日、国際公開番号が国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 7 3 9 1 号、および国際公開日が国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 7 3 9 1 号である国際出願 P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 2 6 8 2 号に開示およびクレームされており、上記明細書はその全開示が参照により本明細書に組み込まれ、化合物 A は実施例 5 8 の化合物である。化合物 A は国際出願 P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 2 6 8 2 号に記載されている通りに調製することができる。

【 0 0 8 0 】

50

本発明の組合せでの使用に適した P I 3 K 阻害剤、特に 2 , 4 - ジフルオロ - N - { 2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミド

【化 5】



10

は、国際公開第 0 8 / 1 4 4 4 6 3 号 (実施例 3 4 5) に従って調製することができる。

【 0 0 8 1 】

試験 1 : 腫瘍細胞系における化合物 A、化合物 B およびその組合せの *in vitro* の細胞増殖阻害およびアポトーシス誘導

結腸癌細胞系

実験準備 (1 つまたは複数)

ヒト結腸癌由来の細胞系のパネルを用いて、化合物 A および B の組合せ薬物試験を行った ($n = 25$) (表 1)。細胞系を [ATCC (Manassas, VA, USA) または DSMZ (Braunschweig, Germany) から] 購入し、2 mM グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウムおよび 10 % ウシ胎仔血清を添加し加湿恒温器内で 37 °C および 5 % CO_2 に維持した RPMI - 1640 中で増殖させた。

20

【 0 0 8 2 】

実験プロトコル (1 つまたは複数)

固定比率薬物併用アッセイ

固定比率薬物併用アッセイの希釈法のデザインを図 1 に示す。まず、試験化合物を 100 % ジメチルスルホキシド (DMSO) で 10 mM のストックとして調製した。化合物を DMSO でさらに希釈した。96 ウェルマイクロタイタープレートの B - E 行で、第一の試験化合物 (化合物 A と呼ぶ) を 10 希釈ポイント分の 3 倍希釈系列を用いて水平方向に希釈する。別の 96 ウェルマイクロタイタープレートの D - G 行で、第二の試験化合物 (化合物 B と呼ぶ) を 10 希釈ポイント分の 3 倍希釈系列を用いて水平方向に希釈する。各薬物プレートから 2 つの化合物を等体積で組み合わせて細胞培地に加える。これで細胞培地中の薬物が 1 : 50 の希釈となる。プレートの B および C 列では化合物 A が個別に漸増され、F および G 列では化合物 B のみが投与される。細胞に添加する前に薬物をさらに 1 : 10 で希釈する。細胞への薬物添加により、薬物が 1 : 2 にさらに希釈される。薬物プレートから細胞までの全体の希釈は 1 : 1000 である。最終投与濃度の範囲は、化合物 B が 0.1 ~ 1000.0 nM、化合物 A が 0.5 ~ 10000.0 nM であった。陽性対照は、0.1 % DMSO および細胞を含むが薬物は含まない培地からなる。陰性対照は 0.1 % DMSO 溶液を含む培地からなる。

30

【 0 0 8 3 】

アッセイを 96 ウェルマイクロタイタープレートで、各細胞系の以前の研究から推定される適当な播種密度で行った。投与後、細胞系を湿り空气中、37 °C、5 % CO_2 で 72 時間インキュベートする。細胞増殖を、製造者プロトコルに従い Cell Titer Glo (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 試薬を用いて測定する。プレートを Cell Titer Glo 溶液で処理し、Molecular Devices SpectraMax M5 (Sunnyvale, CA, USA) プレートリーダーを用いて RLU (相対発光量) を解析する。

40

【 0 0 8 4 】

データ解析

結果を化合物添加値の時 (T_0) に存在する細胞数の百分率として表し、化合物 (1 つまたは複数) 濃度に対してプロットする。Microsoft Excel 用の IDBS

50

X L f i t プラグイン 2 0 5 モデルにパーセント強度値を用い、 $g I C_{50}$ 値を 4 パラメーターロジスティックフィットを用いて計算した。細胞を含まないウェルの値を差し引いてバックグラウンド補正を行う。増殖域の中間点 ($g I C_{50}$) は、化合物添加時の細胞数と D M S O 処置した対照細胞の 7 2 時間における増殖との中間に当たる。時間ゼロでの細胞数を反応曲線の底の強度値 ($Y_{m i n}$) から分離して、細胞死の測定単位 ($Y_{m i n} / T_0$) を求める。1 未満の $Y_{m i n} / T_0$ 値は、それより高い値と比べて処置の効力が強いことを示す。2 回反復アッセイでは、全反応測定基準の平均値を求めて表す。

【 0 0 8 5 】

独立した 3 つの測定基準を用いて、化合物 B と化合物 A の増殖阻害に対する併用効果を解析した。

【 0 0 8 6 】

データ解析

独立した 3 つの測定基準を用いて、化合物 B と化合物 A の増殖阻害に対する併用効果解析した。

1 . Excess over Highest Single Agent (EOHSA) 薬物の併用効果を測定するための標準的な基準の 1 つは、細胞増殖に対する絶対的な効果を解析することである。この場合、薬物の組合せを、2 つの個別の治療剤 (単一薬剤) のうち反応性の高い方と比較する。各組合せ実験では、各用量について、最も高い単一薬剤に対するパーセント効果を曲線に従って求める。この「Excess of Highest Single Agent (EOHSA)」の測定は、薬物併用の相乗作用の評価に用いられる基準の 1 つである (Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, Serbedzija G, Zimmermann GR, Foley MA, Stockwell BR, Keith CT. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24; 100 (13): 7977 - 82)。

【 0 0 8 7 】

2 . Bliss 相乗作用 併用の相乗作用を判定するためによく用いられる 2 つ目の基準は、Bliss 独立作用または「相加性」を上回る阻害を評価することである (Bliss, C. I, Mexico, DF, The Toxicity of Poisons Applied Jointly. Annals of Applied Biology 1939, Vol 26, Issue 3, August 1939)。このモデルでは、2 つの化合物を合計した反応を下式:

$$\text{スコア} = E_a + E_b - (E_a * E_b)$$

を用いて別個に推測し、式中、 E_a は化合物 A の効果 (またはパーセント阻害) であり、 E_b は化合物 B の効果である。得られた 2 つの化合物の併用効果を、Bliss による予測相加性と比較し、各用量について相乗作用スコアを反応曲線に従って求める。

【 0 0 8 8 】

3 . 併用指数 (CI) 相乗作用評価のための 3 つ目の基準は、Chou および Talalay から導かれる併用指数 (CI) である (Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul. 1984; 22: 27 - 55)。以下の方程式:

【数 1】

$$\text{併用指数} = \frac{a : b \text{ での } D_a}{I C_{50(a)}} + \frac{a : b \text{ での } D_b}{I C_{50(b)}} + \frac{(a : b \text{ での } D_a) + (a : b \text{ での } D_b)}{(I C_{50(a)}) (I C_{50(b)})}$$

は、異なる作用機序で振舞う化合物に用いられるモデルである (互いに非排他的な式)。

10

20

30

40

50

CI が小さいほど、その併用は潜在的に高い相乗作用を有する。1 よりも大きい CI は、試験対象の組合せが拮抗的であり得ることを示す。また 25 % (IC_{25}) および 75 % (IC_{75}) の阻害濃度の CI スコアも、上式中の IC_{50} を各化合物について各阻害濃度で置き換えることにより求める。

【0089】

Microsoft Excel の IDBS XLfit プラグイン 2.0.5 モデルにパーセント強度値を用いて、 gIC_{50} 値を 4 パラメーターロジスティックフィットを用いて計算する。増殖域の中間点 (gIC_{50}) は、化合物添加時の細胞数と DMSO 処置した対照細胞の 72 時間における増殖との中間に当たる。時間ゼロでの細胞数を反応曲線の底の強度値 (Y_{min}) から分離して、細胞死の測定単位 (Y_{min} / T_0) を求める。1 未満の Y_{min} / T_0 値は、それより高い値と比べて処置の効力が強いことを示す。

10

【0090】

EOHSA および Bliss では、適切な命名 (相乗的、やや相乗的など) を行うために、一実験内で両方の技術的反復で相乗作用スコアを見なければならない。併用実験には、単一薬剤として 2 つの化合物での反復だけではなく、組合せの技術的反復も含まれる。

【0091】

極端に低い濃度 (例えば、用量 1、用量 2) での EOHSA および Bliss の相乗作用スコアは変動が比較的大きい傾向があり、一般的には解析から除外する。逆に、治療投与範囲から大きく外れた最も高い濃度 (用量 10) での相乗作用スコアは、観察される効果がオフターゲット事象の影響を比較的受けやすいため、一般的には解析から除外する。

20

【0092】

EOHSA および Bliss 相乗作用の測定には、反応曲線に従って各用量のスコアを求める。スコアは、「拮抗的」 (< -10)、「相加的」 ($-10 \sim 10$)、「やや相乗的」 ($10 \sim 20$) または「相乗的」 (> 20) に分類した。これらのスコアは、解釈するモデルに応じて、最高の薬剤を超える百分率または Bliss 相加性を超える百分率を反映するものである。

【0093】

併用指数では、CI が小さいほど、その併用は潜在的に高い相乗作用を有する。0 ~ 0.7 の間のスコアを相乗的である見なし、0.7 ~ 0.9 の間のスコアをやや相乗的であると見なした。他のスコアはすべて、併用指数では相乗作用を示さないものとした。

30

【0094】

組合せのうちの 1 つの化合物が 25 % の阻害濃度に到達しない細胞系では、CI を算出することはできず、CI に関しては「NA」と記載した。

【0095】

細胞系変異データ

KRAS、BRAF、PIK3CA および PTEN 遺伝子の状態に関する点突然変異データを収集した。データ源は、Catalog of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) のデータベースの一部として公開されている癌細胞系変異スクリーニングデータである (Bamford S. ら, Br. J. Cancer. 2004. 91: 355 - 58)。増殖アッセイで使用する細胞系の同一性が COSMIC データベースのものと確実に一致するように、感受性スクリーニングの細胞系と COSMIC との間で遺伝子型比較を行った。具体的には、以下のことを伴った：

40

1. Affymetrix 500K 「SNP Chip」 (Affymetrix, Inc.、Sunnyvale, CA) および RLM アルゴリズム (Rabbie および Speed, Bioinformatics, 2006. 22: 7 - 12) を用いた各細胞系の遺伝子型の予測。

2. COSMIC において変異プロファイルを有する各細胞系に関して予め予測されたものに対する各細胞系の遺伝子型マッチの確認。

3. 遺伝子型一致に基づく各細胞系の変異状態の選定。

【0096】

50

結果

細胞系の一部においてすべての遺伝子に変異していた。K R A S の遺伝子変異が試料の 60 % (15 / 25) で見られ、P I K 3 C A が細胞系の 40 % (10 / 25) で、B R A F が細胞系の 20 % (5 / 25) で、また細胞系の P T E N が細胞系の 4 % (1 / 25) で変異していた (表 1 にデータ記載)。

【 0 0 9 7 】

P I 3 K 阻害剤である化合物 B と B R A F 阻害剤である化合物 A の組合せで処置した各細胞系に関して、相乗作用の程度の包括的分類を行った。注目すべきことには、データが低品質であることから細胞系 S W 1 1 1 6 を解析から除外した。少なくとも 1 つの測定基準が相乗的であると採点された場合、その細胞系は相乗効果を有するものと見なした。この基準では、細胞系の 54 % (13 / 24) が相乗効果を示した。1 未満の値がこれより高い値に比べて高い正味の細胞死を示す Y_{min} / T_0 比が、細胞系の 79 % (19 / 24) において細胞毒性が最も高い単一薬剤に比べて減少した。71 % (17 / 24) の細胞系において、化合物 A と B の併用投与により 1 未満の Y_{min} / T_0 比が得られた。結腸癌細胞系の相乗作用および細胞毒性のデータを表 2 に示す。

【 0 0 9 8 】

併用試験で使用した結腸癌細胞系のスコアパネル。

【 表 1 】

細胞系	診断／組織診断	KRAS	PIK3CA	BRAF	PTEN
HT29	癌腫	WT	1345C>A	1799T>A	WT
SW948	腺癌	182A>T	1624G>A	WT	WT
T84	癌腫	38G>A	1624G>A	WT	WT
HCT15	腺癌	38G>A	1633G>A	WT	WT
HCT8	腺癌	38G>A	1633G>A	WT	WT
DLD1	癌腫	38G>A	1633G>A	WT	WT
NCIH508	腺癌	WT	1633G>A	1786G>C	WT
LS174T	腺癌	35G>A	3140A>G	WT	WT
HCT116	癌腫	38G>A	3140A>G	WT	WT
RKO	癌腫	WT	3140A>G	1799T>A	WT
SW1463	癌腫	34G>T	WT	WT	WT
SW837	腺癌	34G>T	WT	WT	WT
SW1116	癌腫	35G>C	WT	WT	WT
SW480	腺癌	35G>T	WT	WT	WT
SW403	癌腫	35G>T	WT	WT	WT
NCIH747	腺癌	38G>A	WT	WT	WT
LS1034	腺癌	436G>A	WT	WT	WT
HCC2998	癌腫	436G>A	WT	WT	WT
NCIH716	腺癌	WT	WT	WT	WT
NCIH630	腺癌	WT	WT	WT	WT
KM12	腺癌	WT	WT	WT	800delA, 385G>T
SW48	腺癌	WT	WT	WT	WT
COLO320DM	腺癌	WT	WT	WT	WT
COLO205	腺癌	WT	WT	1799T>A	WT
SW1417	腺癌	WT	WT	1799T>A	WT

表 1 略語

細胞系 = 細胞系の名称

診断 / 組織診断 = 組織の病理学的診断

K R A S / B R A F / P I K 3 C A / P T E N = 変異状態 ; W T = 野生型

【 0 0 9 9 】

各結腸細胞系の基本測定および相乗作用判定。

【表 2】

細胞系	化合物 A		化合物 B		組合せ		相乗作用測定基準		
	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min} /T ₀	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min} /T ₀	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min} /T ₀	EOHSA	BLISS	併用指数
COLO205	7.3	1.2	12.0	1.4	2.7	<0.1	やや 相乗的	相乗作用 なし	相乗作用
COLO320DM	>10000	4.9	4.7	1.5	8.2	1.2	やや 相乗的	相乗作用 なし	相乗作用
DLD1	198.6	6.7	20.5	1.8	66.4	1.1	相乗作用	相乗作用 なし	相乗作用
HCC2998	2396.1	2.8	4.7	0.9	19.3	0.7	やや 相乗的	相乗作用 なし	相乗作用 なし
HCT116	>10000	9.2	34.2	4.1	94.2	1.3	相乗作用	相乗作用な し	相乗作用
HCT15	>10000	6.1	7.2	2.4	48.9	1.3	相乗作用	やや 相乗的	
HCT8	>10000	9.2	8.4	1.6	42.9	1.3	なし やや 相乗的	やや 相乗的	
HT29	17.2	4.0	7.4	2.0	4.0	0.8	やや 相乗的	やや 相乗的	相乗作用
KM12	>10000	8.8	22.1	1.4	373.4	1.7	相乗作用 なし	相乗作用 なし	
LS1034	>10000	1.9	1.4	0.5	3.6	0.5	やや 相乗的	相乗作用 なし	
LS174T	>10000	7.0	34.1	0.8	332.9	0.8	混合的	やや 相乗的	
NCIH508	365.6	2.1	1.2	0.5	4.2	0.4	やや 相乗的	やや 相乗的	相乗作用
NCIH630	5000.0	1.9	18.3	0.9	2.4	0.7	相乗作用	相乗作用	
NCIH716	>10000	1.3	1.1	0.7	0.1	0.5	やや 相乗的	やや 相乗的	相乗作用
NCIH747	>10000	1.3	2.7	0.5	0.2	0.2	相乗作用	相乗作用	
RKO	8951.3	6.7	10.9	3.0	15.1	0.3	相乗作用	相乗作用	
SW1417	245.6	1.1	1.4	1.3	0.6	0.6	相乗作用	やや 相乗的	相乗作用
SW1463	>10000	1.9	8.2	0.9	142.5	0.5	やや 相乗的	相乗作用	
SW403	>10000	2.7	1.5	0.5	7.4	0.5	相乗作用	相乗作用	
SW48	>10000	4.7	2.6	0.4	29.4	0.7	なし やや 相乗的	なし やや 相乗的	
SW480	>10000	2.9	5.4	1.1	93.5	1.1	相乗作用	やや 相乗的	
SW837	>10000	2.3	6.4	0.8	8.3	0.5	やや 相乗的	やや 相乗的	
SW948	>10000	1.5	0.3	0.4	1.3	0.4	相乗作用 なし	相乗作用 なし	
T84	>10000	2.0	6.0	0.7	5004.7	0.6	相乗作用 なし	やや 相乗的	

10

20

30

40

細胞系 = 腫瘍由来細胞系

$gIC_{50} = 50\%$ の増殖阻害を発生させるのに必要な化合物濃度 (nM)

$Y_{min} = T$ が 0 のときの細胞増殖の % で測定した化合物 B の存在下での (DMSO 対照に対する) 最小細胞増殖 (化合物 B 添加時の細胞数)。負数は $T = 0$ のときと比較した細胞の正味の減少を示す。

$Y_{min} / T_0 = Y_{min}$ 値を T_0 で割ったものを表し、 T_0 値は Y_{min} 濃度 - 反応曲線から導かれ、 T_0 値は化合物添加時の細胞数 (CTG 測定) を表す。

EOHSA = Excess over highest single agent の判定

BLISS = Bliss 相乗作用の判定

Comb Index = 併用指数スコア

【0100】

試験 2: MAPK および AKT / PI3K 経路内の異なる変異をコードする種々の起源由来の癌細胞系に対する BRAF 阻害剤 (化合物 A) と PI3K 阻害剤 (化合物 B) の *in vitro* 併用試験

384 ウェルプレートで薬物併用試験を行った。10% FBS および 1% ペニシリン / ストレプトマイシンを添加した、各細胞型に適した培地中、細胞を 384 ウェルのプレートに 500 細胞 / ウェルで播種し、37、5% CO₂ で一晩インキュベートした。各薬剤の 16 種類の濃度の 2 倍希釈物を、細胞増殖阻害に関して行列状に試験した。試験濃度は、BRAF 阻害剤である化合物 A が 10 μM ~ 0.3 nM、PI3K 阻害剤 (化合物 B) が 5 μM ~ 0.15 nM であった。細胞を化合物の組合せで処置し、37 で 72 時間インキュベートした。製造者プロトコルに従い Cell Titer - Glo (登録商標) 試薬を用いて細胞増殖を測定し、0.5 秒読取りの発光モードに設定した Perkin Elmer EnVision (商標) リーダーセットでシグナルを読み取った。結果を DMSO 処置細胞と比較した阻害百分率で表し、細胞を含まないウェルの値を差し引いてバックグラウンド補正を行った。

【0101】

本試験の目的のために、Excess Over Highest Single Agent (EOHSA) の測定基準を用いて、各化合物間の相乗効果の程度を判定した。EOHSA 計算の詳細な説明は上に記載されている。簡潔には、濃度「a」の化合物 A に対する反応 (無処置試料と比較し、培地のみに対して正規化したパーセント阻害率) (Ra) および濃度「b」の化合物 B に対する反応 (Rb) を、濃度がそれぞれ「a」および「b」である化合物 A および B の混合物に対する反応 (Rab) と比較する。等式は次の通りである:

$Rab > Ra$ と Rb の高い方の値の 10% 増 = 相加的

$Rab < Ra$ と Rb の高い方の値の 10% 減 = 拮抗作用

この式を用いて、Rab が Ra と Rb のうちの最高値よりも 10% 以上高い場合、その薬物の組合せは「相加的」であると見なす。Rab が Ra と Rb のうちの最高値よりも 10% 以上低い場合、その薬物の組合せは「拮抗的」である。この場合、「相加的」な細胞系は「拮抗的」な細胞系よりも相乗的であると考えられる。

【0102】

併用処置に対して相加的に反応する 16 × 16 行列中の組合せの数を数え、表 3 にまとめた。この表では、試験した組合せのうち 20% (試験した 256 のうち 51 の組合せ) を超える組合せが、10% Excess Over the Highest Single Agent (10% EOHSA) よりも大きな値により定義される相加性を示した場合、所与の細胞系に対するその組合せはより有益であるとした (灰色部分)。

【0103】

多発性癌細胞系に対する PI3K 阻害剤と BRAF 阻害剤の併用効果。

10

20

30

40

【表 3】

起源	細胞系	MAPK	PI3K/PTEN	EOHSA を有する薬物組合せの数	EOHSA を上回る%
皮膚	A375P	BRAF ^{V600E}	WT/WT	101	39
結腸	RKO	BRAF ^{V600E}	H1047R/WT	126	49
皮膚	A101D	BRAF ^{V600E}	WT/ G165_*404de	68	27
皮膚	SK-MEL-5	BRAF ^{V600E} NRAS ^{G12V}	WT/inc	110	43
肺	A-549	KRAS ^{G12S}	WT/WT	39	15
結腸	LoVo	KRAS ^{G13D}	WT/WT	50	20
結腸	HCT116	KRAS ^{G13D}	H1047R/WT	51	20
皮膚	SK-MEL-2	NRAS ^{Q61R}	WT/WT	62	24
肺	H1299	NRAS ^{Q61R}	WT/WT	67	26
肉腫	HT-1080	NRAS ^{Q61K}	WT/WT	89	35
乳房	MDA-MB-231	NRAS ^{Q61K}	WT/WT	88	34

【0104】

上のデータは、種々の薬物組合せ (> 20%) が 10% Excess Over Highest Single Agent (EOHSA) を超える阻害活性を示したので、PI3K 阻害剤と BRAF 阻害剤の組合せが、MAPK または AKT / PI3K 経路内の主要な癌遺伝子の変異状態に関係なく、種々の起源由来の種々の癌細胞系に対して有益であることを示している。

【0105】

試験 3：腫瘍細胞系における化合物 A、化合物 B およびその組合せによる *in vitro* での細胞増殖阻害

方法：

細胞系および増殖条件

ヒト黒色腫 A375PF11 系を A375 (ATCC) から誘導した。12R5-1、12R5-3、12R8-1、12R8-3、16R5-2、16R6-3 および 16R6-4 は、1200 および 1600 nM の濃度までの化合物 A 中で増殖させて選択した、A375PF11 細胞の混合集団由来の単一細胞クローンである。細胞系はすべて、10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含有する RPMI 1640 培地で培養した。

【0106】

細胞増殖阻害アッセイおよび組合せのデータ解析。

播種する前にすべての細胞を最小限の 72 時間培養した。細胞を 10% FBS を含有する RPMI 培地の 96 ウェル組織培養プレート (NUNC 136102) で、全細胞とも 1 ウェル当たり 1,000 個の細胞でアッセイした。播種の約 24 時間後、10% FBS

10

20

30

40

50

Sを含有するRPMI倍地中、細胞を化合物または化合物Aと化合物Bのモル比が1:10で一定である2種の薬剤の組合せの10種類の3倍系列希釈物に曝露した。細胞を化合物の存在下で3日間インキュベートした。製造者プロトコールに従いCell Titer Glo (登録商標) (Promega)を添加して、ATPレベルを決定した。簡潔には、Cell Titer Glo (登録商標)を各プレートに加え、30分間インキュベートした後、SpectraMax Lプレートリーダーにより積分時間0.5秒で発光シグナルを読み取った。

【0107】

化合物または化合物の組合せによる3日間の処置、および溶媒(DMSO)処置細胞とのシグナルの比較の後に、細胞増殖阻害を推定した。溶媒(DMSO)処置対照ウェルに対して相対的な細胞増殖を算出した。 $y = \text{溶媒対照の} 50\%$ として、方程式 $y = (A + (B - A) / (1 + (C / x)^D))$ (式中、Aは最小反応(y_{min})、Bは最大反応(y_{max})、Cは曲線の変曲点(EC_{50})およびDはHill係数である)の非線形回帰を用いて、対照細胞増殖を50%阻害する化合物濃度(IC_{50})を内挿した。

10

【0108】

逆補間 IC_{50} 値ならびにChouおよびTalalayにより導かれた互いに非排他的な方程式(Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 1984; 22: 27-55.)を用いて算出した併用指数(CI)を用いて、効力に対する併用効果を評価した。CIの詳細は上に記載されている。一般に、 $CI < 0.9$ 、 $0.9 < CI < 1.1$ 、 $CI > 1.1$ は、それぞれ相乗作用、相加作用、拮抗作用を示す。一般に、CI数が小さいほど相乗作用が強い。

20

【0109】

PetersonおよびNovick(2007)ならびにPeterson(2010) [Peterson JJ, Novick SJ. J Recept Signal Transduct Res 2007; 27(2-3): 125-46, Peterson J. Frontiers of Bioscience S2, 483-503. 2010]により詳細に記載されている非線形混合の概念に基づき、Excess Over Highest Single Agent (EOHSA)により反応の等級に対する併用効果を定量化した。EOHSA値は、組合せにより得られる、組合せでのその成分用量レベルでの最良の単剤を上回る向上分(ここでは、「百分率ポイント」(ppt)の差)と定義される。EOHSA計算の詳細は上に記載されている。単一薬剤および組合せ処置では、細胞を固定用量比の化合物に曝露し、用量反応曲線を実験データにフィットさせ、回帰モデルを用いて解析した。用量反応曲線に従った特定の総用量レベルの IC_{50} で、用量組合せ(IC_{50} に対応する)を決定し、EOHSAの統計的推定を行った。より具体的には、用量d1の薬物1および用量d2の薬物2を含む組合せ薬剤実験では、組合せでの平均反応が、用量d1の薬物1または用量d2の薬物2に対する平均反応よりも良い場合、(すなわち、総用量は $d1 + d2$ と等しい)は、陽性のEOHSAとする。

30

40

【0110】

結果:

ヒト黒色腫細胞系のパネルにおいて、BRAF阻害剤である化合物A、PI3K阻害剤である化合物Bおよびその組合せによる細胞増殖阻害の効果を判定した。平均 IC_{50} (少なくとも2つの独立した実験によるもの)および IC_{50} での併用効果を、BRAF突然変異状態と共に表4にまとめる。BRAF V600E変異を有するA375PF11細胞は、化合物A($IC_{50} = 0.059 \mu M$)または化合物B($IC_{50} = 0.048 \mu M$)の単一薬剤に対して高感受性であった。化合物Aと化合物Bの組合せは、A375PF11細胞における0.74のCI値により示されるように相乗的であった。7種の化

50

化合物 A 耐性クローン (A 3 7 5 P F 1 1 黒色腫細胞系由来の 1 2 R 8 - 3、1 2 R 8 - 1、1 2 R 5 - 3、1 6 R 5 - 2、1 6 R 6 - 3、1 6 R 6 - 4 および 1 2 R 5 - 1) は、化合物 B 単独に反応して 0 . 0 4 1 ~ 0 . 2 1 2 μ M の範囲の IC_{50} を示し、化合物 A と化合物 B の組合せに対しては、化合物 A に対して 0 . 2 5 6 ~ 0 . 0 . 7 3 1 μ M の範囲および化合物 B に対して 0 . 0 2 6 ~ 0 . 0 7 3 μ M の範囲の IC_{50} で反応した。化合物 A と化合物 B の組合せは黒色腫系において細胞増殖阻害の増強を示し、E O H S A 値が 3 ~ 3 4 p p t s であった。

【 0 1 1 1 】

ヒト腫瘍細胞系における化合物 A、化合物 B およびその組合せによる細胞増殖阻害。

【 表 4 】

腫瘍細胞系		変異状態	マイクロモル単位の I C ₅₀ 値 (平均 ± s t d)				I C ₅₀ における併用効果	
			単剤		1 0 : 1 のモル比の組合せでの化合物 A または B			
		KRAS/BRAF	化合物 A	化合物 B	化合物 A	化合物 B	CI	EOHSA (ppt)
黒色腫	A375PF11	BRAF_V600E	0.059 ± 0.011	0.048 ± 0.009	0.044 ± 0.019	0.004 ± 0.002	0.74 ± 0.03	8 ± 2
	12R5-1	BRAF_V600E	>10	0.212 ± 0.038	0.643 ± 0.227	0.064 ± 0.023	N/A	34 ± 1
	12R5-3	BRAF_V600E	>10	0.088 ± 0.002	0.505 ± 0.085	0.050 ± 0.009	N/A	12 ± 2
	12R8-1	BRAF_V600E	>10	0.103 ± 0.016	0.680 ± 0.182	0.068 ± 0.018	N/A	10 ± 2
	12R8-3	BRAF_V600E	>10	0.129 ± 0.024	0.612 ± 0.008	0.061 ± 0.001	N/A	23 ± 4
	16R5-2	BRAF_V600E	>10	0.041 ± 0.018	0.256 ± 0.057	0.026 ± 0.006	N/A	7 ± 3
	16R6-3	BRAF_V600E	>10	0.080 ± 0.017	0.731 ± 0.204	0.073 ± 0.020	N/A	3 ± 3
	16R6-4	BRAF_V600E	>10	0.061 ± 0.010	0.408 ± 0.031	0.041 ± 0.003	N/A	13 ± 6

表 4 略語：

IC_{50} ：細胞増殖を 5 0 % 減少させる、単一薬剤としての化合物の濃度、すなわち化合物 A：化合物 B = 1 0 : 1 のモル比とした併用での化合物 A もしくは B の濃度；

CI；併用指数；N / A = 該当なし

EOHSA：百分率で測定した E x c e s s o v e r H i g h e s t S i n g l e A g e n t。

【 0 1 1 2 】

実施例 1 - カプセル組成物

標準的なツーピースの硬ゼラチンカプセルに下の表 I に示す割合で成分を充填することにより、本発明の化合物の 1 つを投与するための経口剤形を作製する。

【 0 1 1 3 】

10

20

30

【表 5】

表 I

成分	量
<u>N</u> －{3－[5－(2－アミノ－4－ピリミジニル)－2－(1, 1－ジメチルエチル)－1, 3－チアゾール－4－イル]－2－フルオロフェニル}－2, 6－ジフルオロベンゼンスルホンアミド (化合物 A)	1 0 0 m g
2, 4－ジフルオロ－ <u>N</u> －{2－(メチルオキシ)－5－[4－(4－ピリダジニル)－6－キノリニル]－3－ピリジニル} ベンゼンスルホンアミド (化合物 B)	1 0 m g
マンニトール	2 5 0 m g
タルク	5 0 m g
ステアリン酸マグネシウム	2 0 m g

10

【0 1 1 4】

実施例 2 - カプセル組成物

標準的なツーピースの硬ゼラチンカプセルに下の表 I I に示す割合で成分を充填することにより、本発明の化合物の 1 つを投与するための経口剤形を作製する。

【0 1 1 5】

20

【表 6】

表 I I

成分	量
<u>N</u> －{3－[5－(2－アミノ－4－ピリミジニル)－2－(1, 1－ジメチルエチル)－1, 3－チアゾール－4－イル]－2－フルオロフェニル}－2, 6－ジフルオロベンゼンスルホンアミド (化合物 A)	1 0 0 m g
マンニトール	2 0 0 m g
タルク	3 2 0 m g
ステアリン酸マグネシウム	8 0 m g

30

【0 1 1 6】

実施例 3 - カプセル組成物

標準的なツーピースの硬ゼラチンカプセルに下の表 I I I に示す割合で成分を充填することにより、本発明の化合物の 1 つを投与するための経口剤形を作製する。

【0 1 1 7】

【表 7】

表 I I I

成分	量
2, 4－ジフルオロ－ <u>N</u> －{2－(メチルオキシ)－5－[4－(4－ピリダジニル)－6－キノリニル]－3－ピリジニル} ベンゼンスルホンアミド (化合物 B)	1 0 m g
マンニトール	5 0 m g
タルク	2 5 m g
ステアリン酸マグネシウム	2 m g

40

【0 1 1 8】

実施例 4 - 錠剤組成物

下の表 I V に示すスクロース、微結晶性セルロースおよび本発明の組合せの化合物を、

50

示される割合で10%ゼラチン溶液と混合し顆粒化する。湿った顆粒を篩過し、乾燥させて、デンプン、タルクおよびステアリン酸と混合した後、篩過し、打錠する。

【0119】

【表8】

表IV

成分	量	
N- {3- [5- (2-アミノ-4-ピリミジニル) -2- (1, 1-ジメチルエチル) -1, 3-チアゾール-4-イル] -2-フルオロフェニル} -2, 6-ジフルオロベンゼンスルホンアミド (化合物A)	100mg	10
2, 4-ジフルオロ-N- {2- (メチルオキシ) -5- [4- (4-ピリダジニル) -6-キノリニル] -3-ピリジニル} ベンゼンスルホンアミド (化合物B)	10mg	
微結晶性セルロース	250mg	
スクロース	50mg	
デンプン	50mg	
タルク	20mg	
ステアリン酸	2mg	20

【0120】

実施例5 - 錠剤組成物

下の表Vに示すスクロース、微結晶性セルロースおよび本発明の組合せの化合物の1つを、示される割合で10%ゼラチン溶液と混合し顆粒化する。湿った顆粒を篩過し、乾燥させて、デンプン、タルクおよびステアリン酸と混合した後、篩過し、打錠する。

【0121】

【表9】

表V

成分	量	
N- {3- [5- (2-アミノ-4-ピリミジニル) -2- (1, 1-ジメチルエチル) -1, 3-チアゾール-4-イル] -2-フルオロフェニル} -2, 6-ジフルオロベンゼンスルホンアミド (化合物A)	100mg	30
微結晶性セルロース	300mg	
スクロース	40mg	
デンプン	20mg	
タルク	10mg	
ステアリン酸	5mg	40

【0122】

実施例6 - 錠剤組成物

下の表VIに示すスクロース、微結晶性セルロースおよび本発明の組合せの化合物の1つを、示される割合で10%ゼラチン溶液と混合し顆粒化する。湿った顆粒を篩過し、乾燥させて、デンプン、タルクおよびステアリン酸と混合した後、篩過し、打錠する。

【0123】

【表 10】

表 V I

成分	量
2, 4-ジフルオロ-N- { 2- (メチルオキシ) - 5- [4- (4-ピリダジニル) - 6-キノリニル] - 3-ピリジニル } ベンゼンスルホンアミド (化合物 B)	1 0 m g
微結晶性セルロース	6 0 m g
スクロース	5 m g
デンプン	1 0 m g
タルク	5 m g
ステアリン酸	2 m g

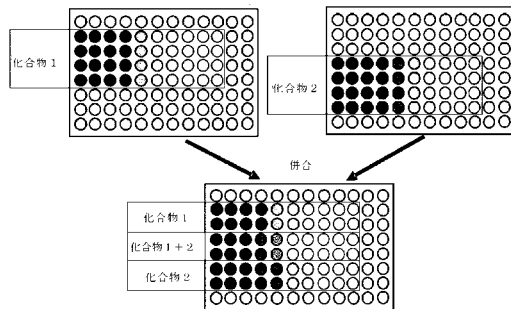
10

【0124】

本発明の好適な実施形態が上で説明されているが、発明が本明細書に開示されている詳細な説明に限定されないこと、および以下の特許請求の範囲内のあらゆる修正の権利が留保されることを理解するべきである。

【図 1】

96ウェルでの固定濃度投与のためのプレート配置を図示したもの。



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 10/52242
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/54 (2010.01) USPC - 514/227.8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 514/227.8 (see search terms below)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 544/331; 544/122; 544/295; 544/58.2; 544/275 (see search terms below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO-WEST - PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB keywords: thiazole compounds, treatment, cancer, pharmaceutical composition, carrier, melanoma, lung, pancreatic, breast, colon, benzenesulfonamide, derivatives, MEK inhibitors, pharmaceutically acceptable salts, mesylate, B-Raf, crystal structure, cocrystal structures, quinoline derivatives, PI3 kinase inhibit		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/084391 A2 (ZENG et al.) 26 July 2007 (26.07.2007), para [0019] - [0020]. This document can be viewed by entering the doc number at the following url: http://ep.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP	1-3, 6-23 and 31-37
Y	US 6,750,217 B2 (BARRETT et al.) 15 June 2004 (15.06.2004), col 2, ln 16-67; col 3, ln 31-38; col 4, ln 10-11; col 18, ln 18-29.	1-3, 6-23 and 31-37
Y	TSAI et al., Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity, PNAS Vol 105(8), pp 3041-3046, 26 February 2008, Abstract; pg 3041 - pg 3043; pg 3046.	1-3, 6-23 and 31-37
Y	WO 2008/144463 A1 (ADAMS et al.) 27 November 2008 (27.11.2008), Abstract; pg 17, ln 19 - pg 18, ln 21; pg 37, ln 14-15; pg 44, ln 13 - pg 45, ln 30; pg 46, ln 9-11; pg 57, ln 7-9; pg 67, ln 10-26; pg 68, ln 8-10, 17-19.	1-3, 6-23 and 31-37
P,Y	WO 2009/137391 A2 (ADAMS et al.) 12 November 2009 (12.11.2009), pg 7, ln 21 - pg 8, ln 10; pg 14, ln 1-28; pg 55, ln 20-29. This document can be viewed by entering the doc number at the following url: http://ep.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP	1-3, 6-23 and 31-37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 November 2010 (26.11.2010)		Date of mailing of the international search report 14 DEC 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/52242

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-5 and 24-30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 43/00	1 2 1

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 クルト、オージェ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、カレッジビル、サウス、カレッジビル、ロード、1 2 5 0

(72)発明者 カーティス、アール、バックマン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、カレッジビル、サウス、カレッジビル、ロード、1 2 5 0

(72)発明者 ジョエル、デイビッド、グreshock

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、カレッジビル、サウス、カレッジビル、ロード、1 2 5 0

(72)発明者 トナ、ギルマー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州、リサーチ、トライアングル、パーク、ファイブ、ムーア、ドライブ

(72)発明者 シルビー、ラケル

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、7 0 9

(72)発明者 シャノン、レネ、モリス

アメリカ合衆国ノースカロライナ州、リサーチ、トライアングル、パーク、ファイブ、ムーア、ドライブ

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC41 BC82 GA07 GA08 GA10 GA14 MA02 MA04
NA05 NA14 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZB26 ZC20 ZC75